

УДК 619:579.861.2:636.7:616-076

ВІДПРАЦЮВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ МОНО- І ПОЛІВАЛЕНТНИХ СТАФІЛОКОКОВИХ АНАТОКСИНІВ

Келеберда М.І., Обуховський Ю.М., Обуховська О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Запалення шкіри та слизових оболонок у собак і котів на сьогоднішній день є однією з найбільш розповсюджених патологій [3, 6, 8, 10, 11]. Однак, практичні ветеринарні лікарі часто стикаються з проблемою виникнення рецидивів після проведення курсу антибіотикотерапії або з переходом процесу в хронічну форму. Це пов'язано з тим, що ветеринарні фахівці застосовують для лікування таких патологій стандартні схеми лікування, що включають проведення курсу антибіотикотерапії та місцеве лікування [2, 4, 7, 12]. При цьому найчастіше не враховують стан імунної системи, хоча загально відомим є той факт, що бактеріальні піддермії виникають на фоні імунодефіцитного стану [2, 5, 10].

Відомо, що запалення шкіри та слизових оболонок у дрібних домашніх тварин в більшості випадків спричиняють грампозитивні коки або асоціації бактеріальних культур (грампозитивних коків, ентеробактерій, інших грамнегативних паличок). Але найбільш важливу роль при цих патологіях відіграють стафілококи [1, 3, 9]. Існують схеми лікування, при яких застосовують імунні препарати, виготовлені на основі найбільш широко розповсюджених збудників стафілококових піддермії (АСП) [4]. Однак, не існує на сьогоднішній день аналогічних препаратів, що офіційно зареєстровані на території України. Тому таким актуальним є напрямок досліджень щодо розробки вітчизняних біопрепаратів для лікування стафілококових піддермії дрібних тварин.

Метою наших досліджень було відпрацювання технології виготовлення стафілококових анатоксинів для лікування стафілокозових дрібних домашніх тварин.

Матеріали та методи. Для виготовлення стафілококових анатоксинів застосовували музейні культури стафілококів 3-ох видів, а саме, *Staphylococcus aureus I*, *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*.

Культури вирощували на МПБ із додаванням 1 % глюкози та 10 % сироватки ВРХ. Застосовували наступну схему накопичення бактеріальної маси стафілококів:

1-ий пасаж – 8 годин за температури 37 °С;

2-ий пасаж – 12 годин за температури 37 °С;

3-ій пасаж – 20 годин за температури 37 °С.

Після останнього пасажу бакмасу осаджували центрифугуванням (режим 3000 об/хв., 30 хв.). Супернатант (до складу якого входять нативні екзотоксини) відокремлювали. Анатоксин отримували шляхом додавання до супернатанту 0,5 % формаліну та наступної інактивації впродовж 10 діб за температури 37 °С.

На останньому етапі для отримання полівалентного препарату анатоксини окремих культур стафілококів (два або три) об'єднували *ala partes*¹. Для отримання моновалентного препарату використовували чистий анатоксин з однієї культури стафілококу.

Протективні властивості вивчали в 3-ох дослідах на білих мишах. В кожному досліді було сформовано по дві групи – дослідна та контрольна (по 20 голів кожна). Тваринам дослідних груп вводили анатоксини підшкірно, в дозі 0,3 см³, двічі, зі строком ревакцинації 7 днів. Контрольні групи залишались інтактними.

Через 14 діб тварин дослідних і контрольних груп заражали відповідними культурами стафілококів підшкірно в об'ємі 0,3 см² (табл. 1).

Таблиця 1 – Схема контрольного зараження тварин

№ дослідної групи	Препарат, що був застосований для імунізації	Культура або суміш культур, що були застосовані для контрольного зараження	Доза
1.	Анатоксин моновалентний (<i>Staphylococcus aureus I</i>)	<i>Staphylococcus aureus I</i>	1 млрд. КУО
2.	Анатоксин бівалентний (<i>Staphylococcus aureus I</i> та <i>Staphylococcus epidermidis S</i>)	<i>Staphylococcus aureus I</i> та <i>Staphylococcus epidermidis S</i>	По 0,5 млрд. КУО кожної культури
3.	Анатоксин полівалентний (<i>Staphylococcus aureus I</i> , <i>Staphylococcus epidermidis S</i> та <i>Staphylococcus intermedius C</i>)	<i>Staphylococcus aureus I</i> , <i>Staphylococcus epidermidis S</i> та <i>Staphylococcus intermedius C</i>	По 0,3 млрд. КУО кожної культури

За тваринами спостерігали впродовж 10 діб, при цьому обліковували кількість хворих та загинувших особин, наявність певних клінічних та патологоанатомічних ознак.

Від загинувших та клінічно хворих тварин відбирали патологічний матеріал (серце, печінку, селезінку, трубчасту кістку) для проведення бактеріологічних досліджень за стандартною методикою.

Результати досліджень. У процесі проведення експериментальних досліджень ми відпрацювали технологію виготовлення препаратів для лікування стафілокозових дрібних домашніх тварин (моно- та полівалентних стафілококових анатоксинів). Технологія включала наступні етапи:

- накопичення бактеріальної маси стафілококів впродовж 3-х послідовних пасажів на рідких поживних середовищах;
- відокремлення нативних екзотоксинів;
- отримання анатоксинів;
- виготовлення та контролювання готового препарату.

Всього виготовили 3 експериментальні серії анатоксинів:

перша – анатоксин моновалентний з культури *Staphylococcus aureus I*;

друга – анатоксин бівалентний з культур *Staphylococcus aureus I* та *Staphylococcus epidermidis S*;

третья – анатоксин полівалентний з культур *Staphylococcus aureus I*, *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*.

Отримані препарати (моно- і полівалентні анатоксини) були перевірені на стабільність, стерильність згідно з ДСТУ 4483 та нешкідливість згідно з ДСТУ 46.024. Доведено, що препарати є стабільними, стерильними та нешкідливими.

Протективні властивості препаратів вивчали в досліді на білих мишах. Дослідні групи тварин імунізували двічі відповідними моно- та полівалентними анатоксинами. Через 14 діб заражали культурами стафілококів (табл. 1).

Результати спостереження за тваринами в першому досліді наведені в таблиці 2.

¹ в рівних частинах

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

Таблиця 2 – Протективні властивості моновалентного анатоксину з культури *Staphylococcus aureus I*

Результати спостережень за тваринами	Дослідна група, n (%)	Контрольна група, n (%)
Захворіло	1 (5 %)	20 (100 %)
Загинуло	–	20 (100 %)

На другу добу після зараження усі тварини контрольної групи захворіли із наявними ознаками септичного стану – пригнічений стан, відмова від їжі, м'язевий тремор, діарея. Починаючи з 3-ої доби впродовж 48 годин усі миші загинули, при розтині спостерігали такі патологоанатомічні зміни: геморагічний перикардит, гепатит, холецистит, спленіт, геморагічний ентерит, у трьох особин – асцит. З крові серця, печінки, селезінки та трубчастій кістки загиблих тварин було ізольовано культуру *Staphylococcus aureus I*.

З тварин дослідної групи захворіла одна особина із вираженою клінікою кишкової інфекції, однак на 10-ту добу спостереження жодна з тварин не загинула.

Результати спостереження за тваринами в другому досліді наведені в таблиці 3.

Таблиця 3 – Протективні властивості бівалентного анатоксину з культур *Staphylococcus aureus I* та *Staphylococcus epidermidis S*.

Результати спостережень за тваринами	Дослідна група, n (%)	Контрольна група, n (%)
Захворіло	2 (10 %)	20 (100 %)
Загинуло	–	20 (100 %)

Схожі результати були отримані в групі мишей, що були імунізовані бівалентним анатоксином. На третю добу після зараження усі тварини контрольної групи захворіли із наявними ознаками септичного стану – пригнічений стан, відмова від їжі, м'язевий тремор, діарея. Упродовж 3-6-ої доби спостереження усі тварини загинули, при розтині спостерігали такі патологоанатомічні зміни: гемарогічний перикардит, гепатит, холецистит, спленіт, гемарогічний ентерит, у п'яти особин – асцит. З крові серця, печінки, селезінки та трубчастій кістки загиблих тварин були ізольовані культури *Staphylococcus aureus I* та *Staphylococcus epidermidis S*.

З тварин дослідної групи захворіло дві особини із вираженою клінікою кишкової інфекції. На 10-ту добу ці тварини були примусово вбиті, при розтині зареєстровані такі патологоанатомічні зміни: гепатит, холецистит, гемарогічний ентерит. З селезінки та трубчастих кісток вбитих тварин були ізольовані культури *Staphylococcus aureus I* та *Staphylococcus epidermidis S*.

На останньому етапі роботи були проведені досліді щодо вивчення властивостей полівалентного анатоксину (табл.4).

Таблиця 4 – Протективні властивості полівалентного анатоксину з культур *Staphylococcus aureus I*, *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*

Результати спостережень за тваринами	Дослідна група, n (%)	Контрольна група, n (%)
Захворіло	3	20
Загинуло	–	20

На третю добу після зараження миші контрольної групи захворіли із наявними ознаками септичного стану – пригнічений стан, відмова від їжі, м'язевий тремор, діарея. Впродовж 3-5-ої доби спостереження усі тварини загинули, при розтині зареєстровані такі патологоанатомічні зміни: гемарогічний перикардит, гепатит, холецистит, спленіт, гемарогічний ентерит, у шести особин – асцит. З крові серця, печінки, селезінки та трубчастій кістки усіх загиблих тварин було ізольовано культуру *Staphylococcus aureus I*; у 8-ми особин – також культури *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*.

Три особини з дослідної групи захворіли із вираженою клінікою кишкової інфекції. На 10-ту добу спостереження ці тварини були примусово вбиті, при розтині зареєстровані такі патологоанатомічні зміни: гепатит, холецистит, спленіт, гемарогічний ентерит. З селезінки, печінки та трубчастій кістки усіх вбитих тварин було ізольовано культуру *Staphylococcus aureus I*, у однієї – також культури *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*.

Таким чином, застосування моновалентного стафілококового анатоксину (з культури *Staphylococcus aureus I*) забезпечує захист 100 % лабораторних тварин (білих мишей) від загибелі та 95 % від зараження гомогенною культурою стафілококу. Застосування бівалентного анатоксину (з культур *Staphylococcus aureus I* та *Staphylococcus epidermidis S*) забезпечує захист 100 % лабораторних тварин від загибелі та 90 % від зараження відповідними культурами стафілококів. Полівалентний анатоксин (з культур *Staphylococcus aureus I*, *Staphylococcus epidermidis S* та *Staphylococcus intermedius C*) забезпечує захист 100 % білих мишей від загибелі та 85 % від зараження відповідними культурами стафілококів.

Висновки. Відпрацьовано 4-ох ступеневу технологію виготовлення препаратів для лікування стафілококозів дрібних домашніх тварин (моно- і полівалентних стафілококових анатоксинів), що дозволяє отримати стерильні, стабільні та нешкідливі препарати.

Виготовлено 3 експериментальні серії стафілококових анатоксинів, які за умов дворазового введення, захищають 100 % білих мишей від загибелі та забезпечують від 85 % до 95 % захисту від зараження відповідними культурами стафілококів.

Перспективи подальших досліджень. Відпрацьована нами технологія виготовлення стафілококових анатоксинів буде застосована в подальших дослідженнях щодо створення біопрепаратів для лікування стафілококозів дрібних домашніх тварин.

Список літератури

1. Акатов, А.К. Стафілококки [Текст]/ А.К. Акатов, В.С. Зуева. – М.: Медицина, 1983. – 256 с. 2. Ваганова, І.Ю., Некоторые аспекты течения и лабораторной диагностики заболеваний кожных покровов у домашних животных [Текст]/ И.Ю. Ваганова, А.Е. Юрченко// Пробл. вет. обслуживания дрібних домашніх тварин: Мат-ли V міжнар.наук.-практ.конф. (18-19.10.2000 р., м.Київ). – Київ, 2000. – С. 24-26. 3. Гаскел, Р.М. Справочник по инфекционным болезням собак и кошек [Текст]: пер.с англ./ Р.М. Гаскел, М. Беннет. - М.:Аквариум ЛТД, 1999. – С. 166-168, 185-186

4. Зорин, В.Л., Краткие ветеринарные консультации [Текст]/ В.Л. Зорин, А.И. Зорина – М.: Аквариум ЛТД, 1999. – С. 9-20. 5. Инфекционные болезни животных [Текст]: справочник/ Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кириллов; Под общ. ред. Д.Ф. Осидзе. – М.: Агропромиздат, 1987. – 288 с. 6. Игнатов, П. Очерки об инфекционных болезнях собак [Текст]/ П. Игнатов. – М.: Мир, 1995. – С. 48-59. 7. Лабораторные исследования в ветеринарии [Текст]/ Под ред. В.Я. Антонова и П.Н. Блинова. – М.: Колос, 1974. – 320 с. 8. Максимов, Н.А. Клинические признаки и результаты бактериологических исследований при пиодерматитах собак [Текст]/ Н.А. Максимов, С.И. Лебедько, А.И. Албулов, С.М. Шинкарев//11-ый Моск.международ.вет.конгресс: Мат-лы (17-19.04.03 г., М.). – М., 2003. – С. 14-15. 9. Медицинская микробиология [Текст]/ Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: Гэзар медицина, 1999. – 1200 с. 10. Ниманд, Х.Г. Болезни собак [Текст]: Пер. с нем./Х.Г. Ниманд, П.Б. Сутер. – М.: Аквариум ЛТД, 2001. – С. 271-284. 11. Патерсон, С. Кожные болезни собак [Текст]: пер.с англ./ Под ред Е. Осипова. – М.: Аквариум, 2003. – 176 с. 12. Тамошкин, Д.А., Антибиотикотерапия в ветеринарии [Текст]/ Д.А. Тамошкин, В.В.Сотников, М.В. Сотников// I-а міжнар. Нук.-прак. конф. з проблем дрібних тварин: Мат-ли (29-31.05.02 р.,Одеса). – Одесса, 2002. – С. 157-162.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF MONO-AND POLYVALENT STAPHYLOCOCCUS ANATOXINS

Keleberda N.I., Obuhovsky J.M., Obuhovska O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

4-stages scheme of development of mono-and polyvalent Staphylococcus anatoxins from the museum's cultural Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus intermedia was developed.

3 experimental series of Staphylococcus anatoxins were prepared. Its preparations in course of double using, protect 100 % of the experimental animals from disaster, and provide from 85 to 95 % protection from infection with the relevant Staphylococcus culture.

УДК 619 616.98:578.825.1

РЕПРОДУКЦІЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ У ГЕТЕРОЛОГІЧНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА ОТРИМАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

Кривошия П. Ю., Мандигра М. С., Кот Л. Б.

Інститут епізоотології НААН, м. Рівне

Інфекційні захворювання завжди домінували серед патологій коней. Останніми роками в країнах світу, в тому числі розвинутих, інфекції посідають одне з перших місць серед усіх захворювань. В Україні практично третина коней з року в рік хворіє. Проте це лише деяка частина захворюлих тварин, оскільки багато інфекцій не розпізнаються, інші не обліковуються як інфекційні захворювання.

Інфекційна анемія (ІНАН) коней посідає одне з перших місць щодо розповсюдження серед цих хвороб. Основна перепона у вивченні ІНАН – складність виділення збудника в культурі клітин.

Першими про вирощування вірусу інфекційної анемії в клітинній культурі повідомили японські дослідники Кобаясі та Коно [4]. Вірус розмножувався в клітинах кісткового мозку та лейкоцитах периферичної крові коней, зумовлюючи цитопатичні зміни. Однак культивування лейкоцитів і клітин кісткового мозку є досить трудомістким процесом, причому ще існує загроза контамінації герпес вірусом. Лише через досить тривалий період, шляхом довготривалих пасажувань почали вирощувати вірус на первинних культурах клітин ембріона коня та перещеплюваних лініях [1, 2, 3]. Вірус розмножувався у клітинах, не викликаючи цитопатичної дії, але накопичувався в культуральній рідині.

У зв'язку з тим, що вірус розмножувався на культурі без видимих морфологічних змін клітин, його індикація можлива була лише при використанні таких реакцій, як дифузна преципітація (РДП) та реакція зв'язування комплементу (РЗК). Для проведення РДП необхідне використання досить концентрованого антигену, а РЗК – трудомістка, вимагає відповідних очисток антигену та досліджуваних сироваток, численних титрацій, добору оптимальних доз, що ускладнює стандартизацію отриманих результатів.

На теренах СНД діагностиком для ІНАН коней виробляє Щолківський біокомбінат (Росія). Групспецифічний антиген для діагностичного набору з використанням у реакції дифузної преципітації (РДП) отримують із селезінки хворих на інфекційну анемію коней. Тканинний селезінковий антиген вірусу ІНАН – високоспецифічний діагностиком, однак для його виробництва потрібна спеціальна база для утримання великої кількості коней, що призводить до значних матеріальних затрат та зниження стандартності препарату внаслідок різної та неоднорідної сировини. З огляду на це, все більшого значення набуває пошук інших можливостей для отримання культурального антигену вірусу ІНАН. Відсутність компонентів діагностики ІНАН коней в Україні обумовила необхідність таких досліджень.

Мета роботи. Метою нашої роботи є виділення та серійне пасажування різних штамів вірусу ІНАН в гетерологічній культурі клітин і використання отриманого вірусного антигену для серологічної діагностики в реакції нейтралізації.

Матеріали та методи. Віруси: польовий штам К-1, виділений від хворого коня на інфекційну анемію, виробничий штам «3-ВІСВ-К», культивовані на культурі клітин шкіри та нирки ембріона коня в підтримуючому середовищі, до складу якого входило 49 % Ігла, 49 % 199 та 2 % сироватки великої рогатої худоби при рН 7,6. Інфекційну активність вірусів після їх адаптації до первинної та субкультури клітин курячих ембріонів визначали за цитопатичною дією на даній культурі.

Наявність вірусу в культуральній рідині визначали в реакції нейтралізації та реакції дифузної преципітації, які проводили за загальноприйнятими методами. Як позитивний контроль використовували набір антигену та антисироватки для діагностики ІНАН у РДП виробництва Щолківського біокомбінату.

Результати досліджень. Для адаптації вірусу ІНАН до культур гетерологічного походження нами проводилося інфікування вірусом ІНАН як гомологічних первинних культур (нирки та шкіри коня), так і гетерологічних (первинні культури клітин ембріона курчати та перещеплювана культура трахеї теляти). Періодичними пасажами різних штамів ІНАН нами були виділені штами, які при пасажуванні викликали прояв цитопатичної дії на культурі клітин гетерологічного походження. Прояв цитопатичної дії залежно від пасажу вірусу на перещеплюваній культурі трахеї теляти наведено в таблиці 1.

Так, при пасажуванні вірусного матеріалу на первинній культурі клітин курячого ембріона проходила адаптація вірусу до даної культури. Це підтверджується наростанням ураження вірусом клітин моношару із збільшенням кількості пасажив, що проявляється в цитопатичній його дії на культуру клітин та зменшенням періоду для повної деструкції моношару. Розмноження вірусу після першого пасажу супроводжувалось округленням клітин. Так, в 3-му пасажі часткова деструкція (25 %) моношару